

# ウイルスベクター法を用いた遺伝子導入虹彩色素上皮細胞移植におけるベクターの局所および全身への播種に関する研究

著者	吉岡 由貴
号	2138
発行年	2004
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/22683">http://hdl.handle.net/10097/22683</a>

氏 名（本籍）

学位の種類 博士（医学）

学 位 記 番 号                      医 博 第 2 1 3 8 号

学位授与年月日 平成 16 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研 究 科 専 攻                  東北大学大学院医学系研究科  
  (博士課程) 医科学専攻

学位論文題目 ウイルスベクター法を用いた遺伝子導入虹彩色素  
上皮細胞移植におけるベクターの局所および全身  
への播種に関する研究

(主 査)

論文審査委員 教授 玉 井 信 教授 貫 和 敏 博

教授 里 見 進

## 論文内容要旨

多くの眼科疾患の予後が手術器具や手術方法、あるいは薬物療法の発達により改善されてきているが、網膜色素変性や加齢黄斑変性など有効な治療法が確立されていない疾患がある。近年、このような失明に至る疾患に対する新たな治療法の開発を目指し、網膜移植や遺伝子治療の研究が進められてきた。

網膜移植においては、網膜色素上皮（RPE）細胞移植や、発生学的に RPE 細胞と起源が同一であり採取が容易である虹彩色素上皮（IPE）細胞を利用する方法が考案された。遺伝子治療では、遺伝子導入の手段にウイルスベクターが用いられている。しかし、一般にウイルスベクターの安全性に関する検討は今のところ十分とはいえない。

今回の研究では、IPE 細胞にウイルスベクターを感染させ、遺伝子を付加した IPE 細胞を網膜下に移植し、ウイルス DNA の眼外への播種の可能性と移植部位の機能的形態的变化について調べた。

研究対象に選んだウイルスベクターは、アデノウイルス（adenovirus；Ad）ベクターとアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus；AAV）ベクターであり、IPE 細胞をこれらのベクターで感染させウイルス感染 IPE 細胞とした。この感染細胞をラット網膜下腔に移植した群と、ウイルスベクター液を直接網膜下注入した群を作成し、全身臓器からゲノム DNA を抽出し、ウイルスベクターの一部を増幅する PCR 法でウイルスベクターを検出した。また、移植部位への影響を検討するため、移植眼の凍結切片からウイルスベクターに組み込まれた LacZ を染色し移植細胞の遺伝子発現を調べた。さらに、網膜電図（ERG）と網膜蛍光造影を施行し、網膜への機能的形態的影響を調べた。

PCR 法の結果、ウイルス注入群に比較して感染細胞移植群ではウイルスの混入は少なかった。また、 $\beta$ -Gal 染色の結果、ウイルス注入群では宿主の RPE 細胞、脈絡膜細胞、神経節細胞、虹彩上皮細胞、毛様体上皮細胞が染色されているのが認められた。一方、感染細胞移植群では、特異的に  $\beta$ -Gal 染色された移植細胞が網膜下に存在し、宿主細胞は染色されていなかった。

全身への影響は少ないとしても、移植後もウイルスベクターが移植細胞内に留まることで、移植部位への副作用があっては網膜機能に影響を及ぼしかねないが、AAV 感染細胞移植後 6 ヶ月の ERG と網膜血管造影の所見より、非感染 IPE 細胞移植との差はみられなかった。したがって、AAV 感染細胞移植においては、長期間の経過観察でも移植眼網膜全体への影響は少ないと判断した。

感染 IPE 細胞移植群の一部において眼球以外の臓器からウイルスベクターの播種が確認され、

ウイルスゲノムや抗原の検出感度の問題や経過観察期間など検討されるべき点はあるが、ウイルスベクターで遺伝子導入した IPE 細胞を移植する方法は、目的臓器以外にウイルスが伝播することから懸念される副作用を少なくできる方法ではないかと考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

外科療法、薬物療法の発達により難治性といわれる疾患の治癒率が改善されているにもかかわらず、網膜色素変性や加齢黄斑変性は有効な治療法が確立されていない。さらに高齢化社会の進行とともにさらに患者数は増加の一途をたどっている。近年、このような失明に至る疾患に対する新たな治療法として、網膜移植や遺伝子治療の研究が進められてきた。本研究はこれらの難治性網膜疾患に対して網膜移植、特に網膜色素上皮（RPE）細胞移植や、発生学的に RPE 細胞と起源が同一であり採取が容易である虹彩色素上皮（IPE）細胞の利用、さらに治療効果を高めるために移植細胞に遺伝子導入を目指している。本研究はその基礎として遺伝子導入の手段に用いられるウイルスベクターの安全性確認を目指している。この研究は実際に臨床応用を目指すにはぜひ調べなければならない課題である。

研究方法は IPE 細胞にウイルスベクターを感染させ遺伝子導入すること、その遺伝子を付加した IPE 細胞を網膜下に移植し、ウイルス DNA の眼外への播種の可能性と移植部位の機能的、形態的变化を観察した。ウイルスベクターには、アデノウイルス（adenovirus；Ad）ベクターとアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus；AAV）ベクターを用い、ウイルス感染 IPE 細胞を作成した。感染細胞をラット網膜下腔に移植した群と、ウイルスベクター液を直接網膜下注入した群を作成し、全身臓器からゲノム DNA を抽出、PCR 法でウイルスベクターを検出した。また、移植部位への影響を検討するため、移植眼の凍結切片からウイルスベクターに組み込まれた LacZ を染色し、移植細胞の遺伝子発現と組織学的検討をした。さらに網膜電図（ERG）と網膜蛍光造影で、機能への影響を調べている。

PCR 法によりウイルス注入群に比較して感染細胞移植群ではウイルスの混入ははるかに少ないことを証明した。また、 $\beta$ -Gal 染色の結果、ウイルス注入群では宿主の RPE 細胞、脈絡膜細胞、神経節細胞、虹彩上皮細胞、毛様体上皮細胞が染色され、その存在が示唆されたが、感染細胞移植群では、特異的に  $\beta$ -Gal 染色された移植細胞が網膜下に存在したのみで、その他の宿主細胞は染色されていなかったことから、播種による全身への広がりのはるかに少ないことを証明した。一方もし移植後もウイルスベクターが移植細胞内に留まることで、移植部位への副作用があっては網膜機能に影響を及ぼしかねないが、AAV 感染 IPE 移植後 6 ヶ月の ERG と網膜血管造影の所見より、非感染 IPE 細胞移植との差はないことから、AAV 感染 IPE 移植においては、長期間の経過観察でも移植眼網膜全体への影響は少ないことを示した。

これらの結果はウイルスベクターで遺伝子導入した IPE 細胞を移植する方法は、目的臓器（今回は眼球）以外にウイルスが伝播することを最小限にする最良の方法であることを明らかにした。これは本方法を臨床応用しようとするとき、その理論的な根拠となる重要な発見であり、博士論文として価値あるものである。論文審査で指摘された当初アデノウイルス（Ad）を対象とした実験を進めていたが、Ad による事故が報告され、対象ベクターを変更せざるをえなかった経緯、BDNF を選択した理由、その他指摘された箇所は的確に訂正加筆されている。